

牛受精卵の凍結融解による微細構造の変化

續木, 靖浩
九州大学農学部畜産学第一教室

藤原, 昇
九州大学農学部畜産学第一教室

毛利, 孝之
九州大学農学部動物学教室

古賀, 脩
九州大学農学部畜産学第一教室

<https://doi.org/10.15017/23345>

出版情報 : 九州大學農學部學藝雜誌. 45 (1/2), pp.63-69, 1990-12. 九州大學農學部
バージョン :
権利関係 :

牛受精卵の凍結融解による微細構造の変化

續木 靖 浩・藤 原 昇
毛 利 孝 之*・古 賀 脩

九州大学農学部畜産学第一教室

動物学教室*

(1990年7月27日受理)

The ultrastructural changes of bovine embryos after freeze-thaw

YASUHIRO TSUZUKI, NOBORU FUJIHARA, TAKAYUKI MŌRI* and OSAMU KOGA

Laboratory of Animal Breeding and Zoological Laboratory,*

Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-06, Hakozaki, Fukuoka 812

緒 言

牛受精卵の形態に関しては現在までいくつかの報告が見られる。特に、Hafez and Sugie (1963) が光学顕微鏡を用いて卵の各発生段階における形態的变化を明らかにして以来、この分野に関する研究が活発になった。Fléchon and Renard (1978) は牛受精卵を走査型電子顕微鏡 (SEM) によって観察し、透明帯が海綿構造であることを確認した。また Brackett *et al.* (1980) は透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて牛受精卵の微細構造を観察し、特に王冠状の形をしたミトコンドリアは、牛を含む有蹄類の卵に特徴的にみられるものであることを示した。

一方、Wilmot (1972) がマウス初期胚を液体窒素で凍結保存することに成功して以降、その技術は種々の哺乳動物にも応用されている (小栗, 1989)。凍結融解した牛受精卵の形態については、Massip and Mulnard (1980) が凍結融解後に胚盤胞を hatching させ、その発生過程をレントゲン写真を用いて経時的に観察し、hatching に至らない凍結融解卵は、栄養芽細胞の構造あるいは性状が凍結融解処理によって変化したためであろうと報告した。ついで Lehn-Jansen and Rall (1983) は、低温顕微鏡を用いて凍結融解過程の牛胚盤胞を観察し、 -25°C までの冷却過程で卵の体積が約半分に減少すること、さらに -20°C から -35°C までの凍結過程で透明帯に亀裂が生じることを示した。また、Mohr and Trounson (1981) は TEM を用いて、凍結融解処理によって生じる受精卵の構造的変化の程度は、卵の発生段階により異なっていること、また胚盤胞で

もっとも著しい変化をうけるのは栄養芽細胞であることを報告した。しかし、牛受精卵の凍結融解後における卵の微細構造の変化、あるいは耐凍剤と卵の構造との関係についてはまだ十分には明らかにされていない。

そこで本研究では、まず牛受精卵を用いて凍結融解による卵細胞の微細構造の変化を明確にするために、新鮮卵と凍結融解卵の組織構造を比較検討し、特に凍結融解後におけるグリセロール除去の有無が、卵の微細構造に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

卵胞刺激ホルモン及びプロスタグランディンを黒毛和種の雌牛に投与して過排卵処理を行い、人工授精後7日目の受精卵を非外科的に採取した (Sugie, 1965)。本実験には胚盤胞及び早期胚盤胞を用いた。新鮮卵の場合は、採卵後ただちに3%グルタルアルデヒドを用い2時間 (5°C) 前固定し、Millonig のリン酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄後、1%の四酸化オスミウム溶液により1時間 (5°C) 後固定した (Sengar and Saacke, 1970)。その後アセトンシリーズで脱水を行いエポキシ樹脂に包埋し、ウルトラミクロトーム (SORVALL MT-1) を用いて厚切片および超薄切片を作成し、厚切片の場合は0.5%トリイジンブルー溶液で染色した。超薄切片については、酢酸ウラン溶液および酢酸鉛溶液でそれぞれ5分間 (室温) 電子染色を行い、TEM (HITACHI HS-9型) で観察した。一方、凍結融解卵の場合は、採取後ただちにグリセロールを3%、6%、10%の割合で含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中にそれぞれ10分間 (室温) ずつおいてグリセ

ロール平衡を行った後、0.25mlの凍結精液用のストローにつめてプログラムフリーザー（ダイサン）で凍結した。凍結速度は室温から -5.0°C までは $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で、この間 $-2.5\sim-3.0^{\circ}\text{C}$ で植氷した後 -35°C までは $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度とし、凍結した後液体窒素中に保存した（志賀ら，1987）。

卵の融解は 37°C の湯湯中にストローを1分間静置して行った。融解後の卵の処理に際して、グリセロールを除去しない区及びグリセロールを除去する区を設定した。まず前者については融解後ただちに固定、脱水及び包埋して切片を作成した後、光顕及び電顕観察を行った。後者に関しては、さらにグリセロールを一段階で除去する方法と段階的に除去する方法によって処理し、両者について比較検討した。一段階法の場合はストロー内で 0.6M のシュクロースの液相と混合することによりグリセロールを除去した。また段階的除去法では20%牛胎仔血清（Gibco）を添加したPBSを用いて、10%、6%、3%および0%の割合にグリセロールを含む溶液を調整し、各々の濃度溶液に卵を5分間（室温）ずつ放置することによってグリセロール除去を行った。その後常法にしたがって処理した後、組織切片を作成し、光顕及び電顕によって観察した。

結 果

採取直後の新鮮卵の場合、光顕による観察で正常と思われた胚盤胞をTEMで観察すると、透明帯に面した部分には栄養芽細胞が形成され、その内側には内細胞塊の細胞が見られた（図1）。さらに胞胚腔に面した部分には内胚葉の細胞が形成されていた。栄養芽細胞には多数のmicrovilliが存在し、細胞間の接合部はtight-junctionとdesmosomeとからなるjunctional complexを形成していた。また栄養芽細胞の細胞質の電子密度は内細胞塊の細胞のものに比べて比較的lowく、ミトコンドリアは卵形あるいは棒状を呈し、細胞内に散在しており内部にクリステ構造がはっきりと確認された。内細胞塊の細胞では、ミトコンドリアは栄養芽細胞の場合と同様に細胞内に散在しており、細胞内にライソソーム様小体が存在していた。また栄養芽細胞及び内細胞塊の細胞には多数の細胞突起がみられ、それらが隣接した細胞と互いに接しているのが観察された。

次に早期胚盤胞についてみると、透明帯に面した細胞にはmicrovilliが良く発達しており、これらの細胞は将来栄養芽細胞になるものと思われた（図2）。細胞内には球形あるいは卵形のミトコンドリアが多く見ら

れ、同一卵内の他の細胞のミトコンドリアに比べかなり電子密度が高くなり、王冠状の形を呈しているものも認められた（図3）。またミトコンドリアは特に核の周辺部に集中していた（図4）。これらの細胞には多数の細胞突起が存在していたが、胚盤胞の細胞と比較すると、数は若干少ないように思われた。またライソソーム様小体が多数存在する細胞も観察され（図2）、さらに、卵のごく一部の細胞が退化しているものも見られた。

一方、凍結融解処理卵では、凍結融解後にグリセロールを除去しなかった卵の場合、胚盤胞の栄養芽細胞、内細胞塊の細胞とも新鮮卵とほとんど同じ構造であった。ただ、これらの細胞においてミトコンドリアのほとんどは球形を呈し、電子密度もlowく、さらにクリステの偏在化が認められた（図5）。

次にグリセロールを一段階法で除去した区及び段階的に除去した区の間に着しい相違点は観察されなかった。光顕による観察で正常な形態を保持していると思われた細胞の原形質膜及び内部オルガネラには、新鮮卵のそれらと比較して大きな差異はなく、特にミトコンドリアは球形、卵形あるいは王冠状を呈し、電子密度もhighく、クリステの偏在化も見られず新鮮卵のものと極めてよく類似していた（図6）。しかし、凍結融解後にグリセロールを除去した卵で、光顕による観察で障害をうけていることが明らかな細胞をTEMで観察すると、原形質膜が崩壊し、内部オルガネラが流出しているものが認められ、また部分的に原形質膜が崩壊し、細胞内容物が露出しているものも認められた。これらの割球細胞は多くの場合変形しており、原形をとどめていなかった。その様な状態でも核は原形を保っていたが、電子密度はかなり不均一であった。またミトコンドリアはそのほとんどが膨化し、内部クリステ構造の見られないものが多かった（図7）。

考 察

採取直後の新鮮胚盤胞の組織構造はすでに報告（Mchr and Trounson, 1981）されているものと同様であった。しかし、早期胚盤胞の細胞において、ミトコンドリアが細胞内に散在せず核の周辺部に集中していたことは、従来の報告にみられない所見であった。

凍結融解後グリセロールを除去しない卵とグリセロールを除去した卵の細胞を比較すると、前者の場合、ミトコンドリアの電子密度の低下、クリステの偏在化が見られたが、後者の場合には、ミトコンドリアは新

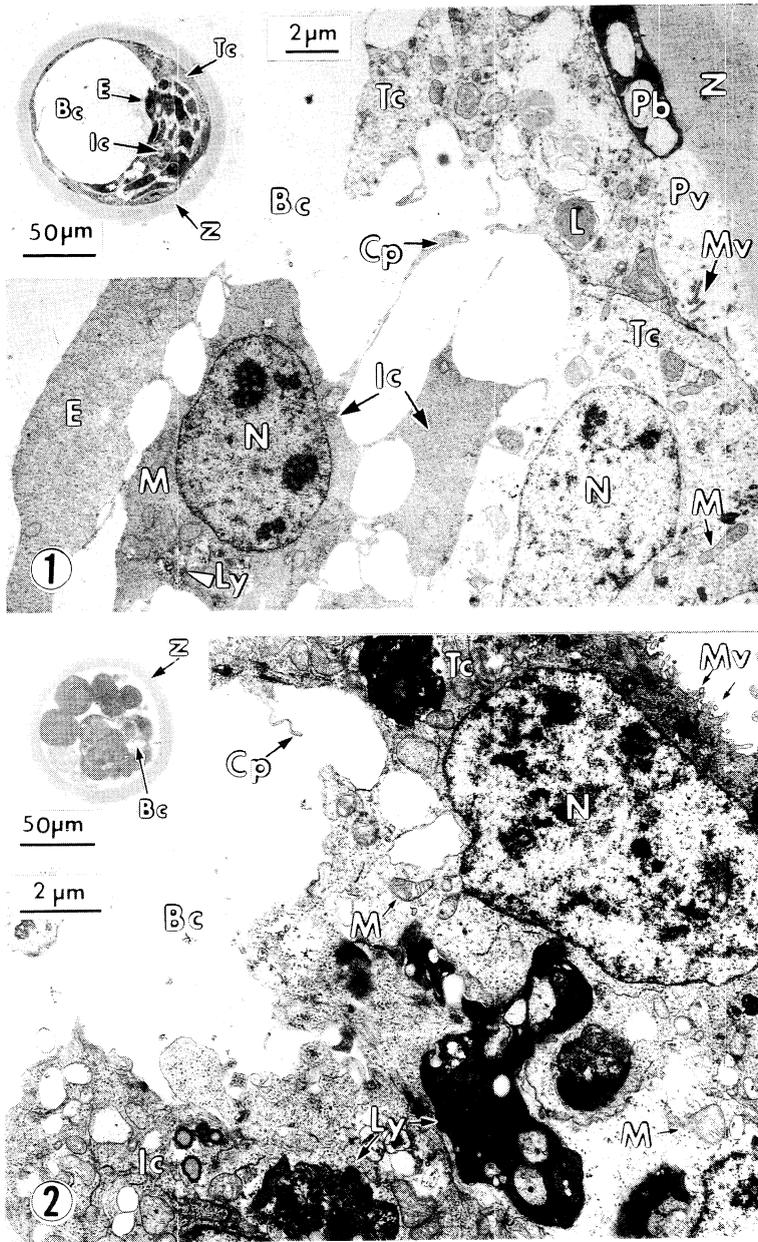


図1 新鮮胚盤胞の電顕像。透明帯(Z)に面した栄養芽細胞(Tc)及びその内側の内細胞塊の細胞(Ic)を示す。さらに胞胚腔(Bc)に面した細胞には内胚葉に分化しつつある細胞(E)が認められる。内細胞塊細胞のライソソーム様小体(Ly)と栄養芽細胞に発達したmicrovilli (Mv)に注意。挿入図は新鮮胚盤胞の光顕像を示す。栄養芽細胞及び内細胞塊細胞の細胞突起(Cp)、核(N)、ミトコンドリア(M)、極体(Pb)、围卵腔(Pv)

図2 新鮮早期胚盤胞の電顕像。

胞胚腔に面した細胞(Ic)と透明帯に面した細胞(Tc)を示す。胞胚腔に面した細胞の細胞突起(Cp)とライソソーム様小体(Ly)に注意。挿入図は新鮮早期胚盤胞の光顕像を示す。

胞胚腔(Bc)、ミトコンドリア(M)、microvilli (Mv)、核(N)、透明帯(Z)

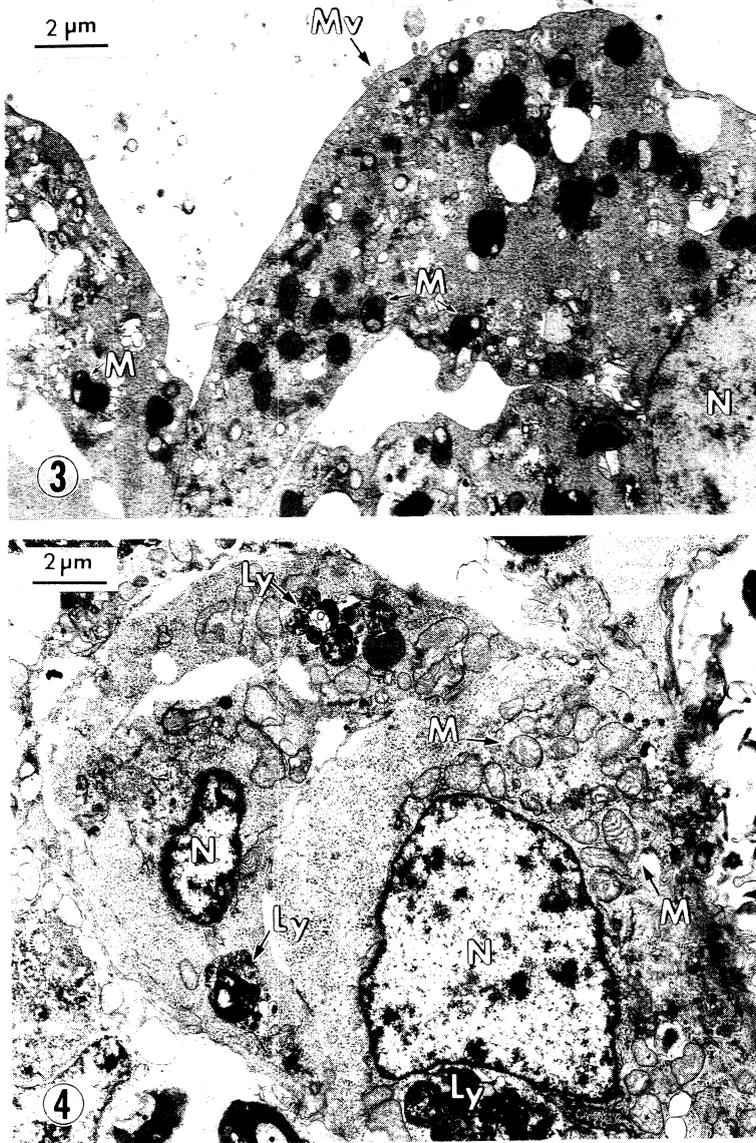


図 3, 4 新鮮早期胚盤胞の電顕像.

3, 透明帯に面した細胞の電子密度が高く王冠状をしたミトコンドリア(M)を示す. microvilli (Mv), 核(N)

4, 胞胚腔に面した細胞の核(N)の周りに集中しているミトコンドリア(M)を示す. ライソソーム様小体(Ly)

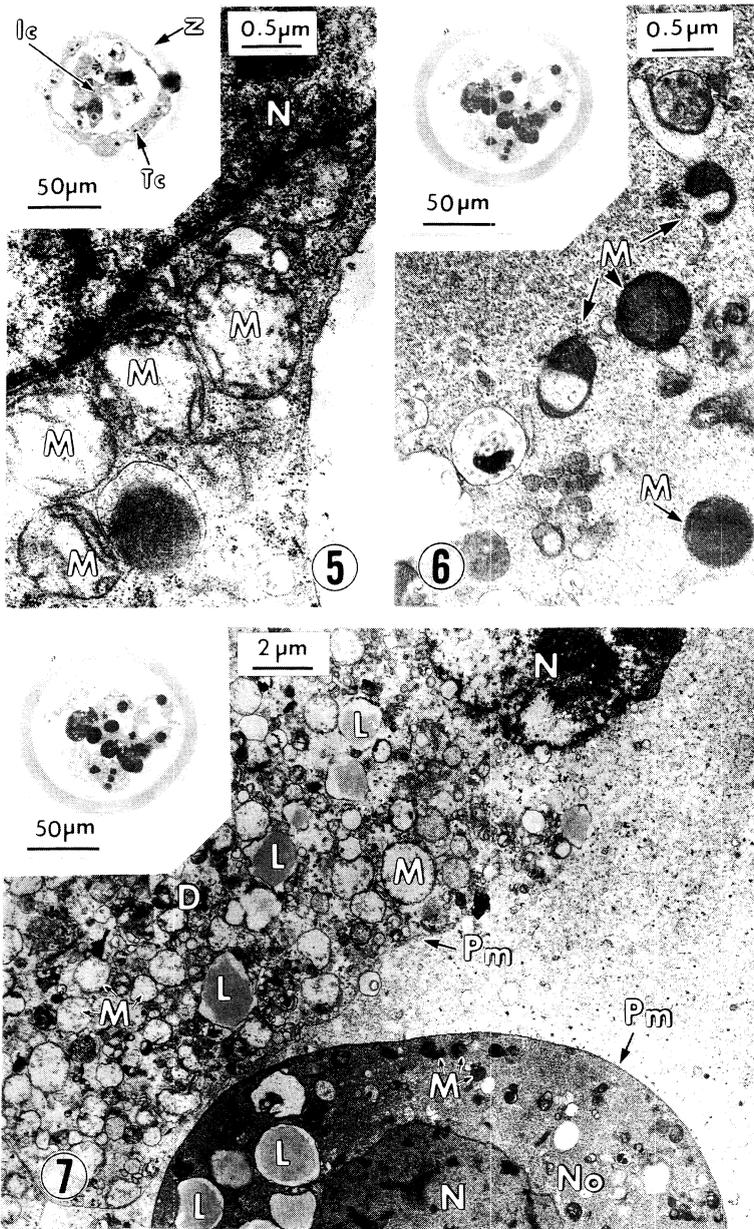


図5 凍結融解後グリセロールを除去しなかった胚盤胞の電顕像。電子密度が低くクリステの偏在化したミトコンドリア(M)を示す。挿入図は凍結融解後グリセロールを除去しなかった胚盤胞の光顕像。内細胞塊の細胞(Ic), 核(N), 栄養芽細胞(Tc), 透明体(Z)

図6, 7 凍結融解後グリセロールを一段階法で除去した早期胚盤胞の電顕像。6, 王冠状を呈し電子密度が高く, クリステに偏在化の見られないミトコンドリア(M)。挿入図は凍結融解後グリセロールを一段階法で除去した早期胚盤胞の光顕像。

7, 正常と思われる細胞(No)と損傷を受けた細胞(D)を示す。正常な細胞と損傷を受けた細胞のそれぞれの核(N)と原形質膜(Pm)に注意。挿入図は図4と同じく凍結融解後グリセロールを一段階法で除去した早期胚盤胞の光顕像。脂肪滴(L), ミトコンドリア(M)

鮮卵のものと同様に電子密度の低下もクリステの偏在化も見られず、両者間に若干の差異が認められた。

次にグリセロールを0.6Mシュークロースを用いて一段階法で除去した卵と段階的に除去した卵とを比較した場合、形態的な差異は認められなかった。これに関連して Mapletoft *et al.* (1987) は凍結融解したマウスの受精卵の場合、グリセロールを一段階法で除去しても段階的に除去しても、その後の胚の発生率には違いがないことを報告しており、グリセロールの除去方法によって受精卵の生理や形態が大きく変化することはないものと考えられた。

さらに凍結融解後グリセロールを除去した卵において、光顕による観察で正常と認められた細胞では、新鮮卵と比較して内部オルガネラに著しい構造変化が認められなかったことは、Mohr and Trounson (1981) の報告とよく一致していた。一方、損傷を受けた細胞に見られた原形質膜の崩壊は、新鮮卵ではほとんど観察されなかったことから、凍結融解処理によって最初に損傷を受けるのは原形質膜であると考えられた。Fujikawa and Miura (1986) はこのような原形質膜の致死的な崩壊は細胞外氷晶の形成によるものであろうと推定している。細胞外氷晶は凍結速度の緩慢化に伴い増大するといわれており、本実験で用いた1°C/分、及び0.3°C/分の凍結速度では原形質膜が損傷をうけるという可能性もあり、受精卵の凍結速度については、さらに検討することが必要であろう。また原形質膜が全体的あるいは部分的に崩壊し、その部位から流出あるいは露出した内部オルガネラはすべて変形していたことから、まず細胞の原形質膜が崩壊し、その結果二次的に内部オルガネラが変化したものと思われた。また膨化変形したミトコンドリアではクリステ構造が観察されないうものが多かった。Tsvetkov *et al.* (1986) は雄ラットの肝臓からミトコンドリアを分離し、凍結後さまざまな融解速度(76°C/分~75°C/分)で融解し、その形態変化を観察して、融解速度が遅くなればなるほど、ミトコンドリアの変形が増大するということを報告していることから、本実験で実施した融解速度(約300°C/分、渡部ら、1989)は卵の組織構造に対して適切でなかったということも考えられる。

以上のことから牛受精卵の凍結融解による微細構造の変化の主なものは、原形質膜の崩壊及びミトコンドリアの変形で、これらが凍結保存した卵を用いた際に見られる低受胎率の原因の一つであろうと推察される。

要 約

本実験では牛受精卵を用いて凍結融解処理した場合の形態的变化を新鮮卵と比較し、さらに耐凍剤としてのグリセロールと卵の構造との関係について組織学的検討を行った。

新鮮卵の場合、胚盤胞では栄養芽細胞及び内細胞塊の細胞に多数の細胞突起がみられた。栄養芽細胞間の接合部には junctional complex が形成されており、また内細胞塊の細胞ではライソソーム様小体が観察された。早期胚盤胞の細胞においても、多数の細胞突起が存在し、ミトコンドリアは核の周辺部に集中していることが認められた。

次に凍結融解後にグリセロールを除去しない卵、グリセロールを一段階法で除去した卵及びグリセロールを段階的に除去した卵の構造についてみると、グリセロールを除去しない場合には、ミトコンドリアは球形で電子密度が低く、さらにクリステの偏在化が認められた。これに対し、グリセロールを一段階法で除去した卵のミトコンドリアは球形、卵形及び王冠状を呈し、電子密度が高く、クリステの偏在性は認められず、その形態は新鮮卵と極めてよく類似していた。なおグリセロールを一段階法で除去した卵と段階的に除去した卵との間に微細構造に関して著しい差異は認められなかった。

また凍結融解後グリセロールを除去した卵において、損傷を受けていることが明らかな細胞で、原形質膜が全体的あるいは部分的に崩壊し、その部位から内部オルガネラが流出ないし露出しているものが観察された。これらの結果から、凍結融解により卵が損傷を受ける場合、まず原形質膜が崩壊し、その後二次的に内部オルガネラが変性するものと考えられた。

謝 辞

本実験に用いた受精卵の採取および凍結保存に御協力いただいた大分県畜産試験場ならびに福岡県畜産研究所に心から御礼申し上げます。

文 献

- Brackett, B.G., Y.K. Oh, J.F. Evans and W.J. Donawick 1980 Fertilization and early development of cow ova. *Biol. Reprod.* 23: 189-205.
- Fléchon, J.E. and J.P. Renard 1978 A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*,

- 53:9-12.
- Fujikawa, S. and K. Miura 1986 Plasma membrane ultrastructural changes caused by mechanical stress in the formation of extracellular ice as a primary cause of slow freezing injury in fruit-bodies of basidiomycetes. *Cryobiology*, 23:371-382.
- Hafez, E. S. E. and T. Sugie 1963 Reciprocal transfer of cattle and rabbit embryos. *J. Anim. Sci.*, 22:30-35.
- Lehn-Jensen, H. and W. F. Rall 1983 Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology*, 19:263-277.
- Mapletoft, R. J. J., S. Moker and W. C. Hagele 1987 Comparison of two methods of removing glycerol from frozen-thawed mouse embryos with sucrose. *Theriogenology*, 27:255 (abstr).
- Massip, A. and J. Mulnard 1980 Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 58:475-478.
- Mohr, L. R. and A. O. Trounson 1981 Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 25:1009-1025.
- 小栗紀彦 1989 家畜胚の凍結保存. 哺乳卵研誌, 6:15-18.
- Senger, P. L. and R. G. Saacke 1970 A method for preparing single mammalian ova for cytological studies using light and electron microscopy. *J. Reprod. Fert.*, 21:177-178.
- 志賀一穂・御手洗善郎・伊藤雅之・岩倉哲雄・内田敏雄 1987 牛受精卵の凍結試験(第1報). 耐凍剤グリセロールの6段階添加及び希釈法による牛凍結受精卵の生存性. 西畜会報, 30:79-81.
- Sugie, T. 1965 Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical technique. *J. Reprod. Fert.*, 10:197-201.
- Tsvetkov, T., L. Tsonev and I. Minkov 1986 A quantitative evaluation of the extent of inner mitochondrial membrane destruction after freezing-thawing based on functional studies. *Cryobiology*, 23:433-439.
- 渡部清彦・星和彦・佐藤章・堀内俊孝 1989 マウス2細胞期胚凍結保存用耐凍剤の検討. 哺乳卵研誌, 6:136-142.
- Wilmot, I. 1972 The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 11:1071-1079.

Summary

We have studied morphological features of fresh and frozen-thawed bovine embryos using light and electron microscopes, focusing on the effect of glycerol on the ultrastructures of the embryos. Special attention was paid to the effect on fine structures of glycerol removal from the embryos after freezing and thawing, comparing with the embryos from which the cryoprotectant was not removed.

In the case of fresh blastocysts, many cytoplasmic projections were observed in the trophoblasts and inner cell masses, and the latter also contained lysosome-like complexes therein. Junctional complexes formed between the trophoblasts were seen. In the early blastocysts, numbers of cytoplasmic projections were also found in the blastomeres, and mitochondria concentrated near the nucleus were characteristic of the cells. Based on the electron microscopic observations, in the embryos from which the glycerol was not removed after thawing, the mitochondria were spherical in shape, with low electron density, and contained peripherally arranged cristae. On the contrary, the embryos with removed glycerol had spherical, oval-shaped or "hooded" mitochondria, with high electron density, being very similar in the ultrastructures to fresh embryos, and no arrangement of the mitochondrial cristae in peripheral was observed. Entire or partial damages to plasma membranes were observed in the blastomeres of some of the frozen-thawed and glycerol-removed embryos, resulting in the breakdown of the cell organelles through the damaged membranes.

The results obtained from this experiment indicate that freeze-thaw of the bovine embryos may partly bring about the damage to plasma membranes of the blastomeres, following by the denaturation of the cell organelles.